

**Untersuchungen zum Nachweis und zur
in Vitro - vermehrung menschlicher Warzenviren**

von
Wolfgang Dippold
aus
Bamberg

1976

Aus dem Institut für klinische Virologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. H. zur Hausen

Untersuchungen zum Nachweis und zur in Vitro - vermehrung menschlicher Warzenviren

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg**

**vorgelegt
von
Wolfgang Dippold
aus
Bamberg**

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



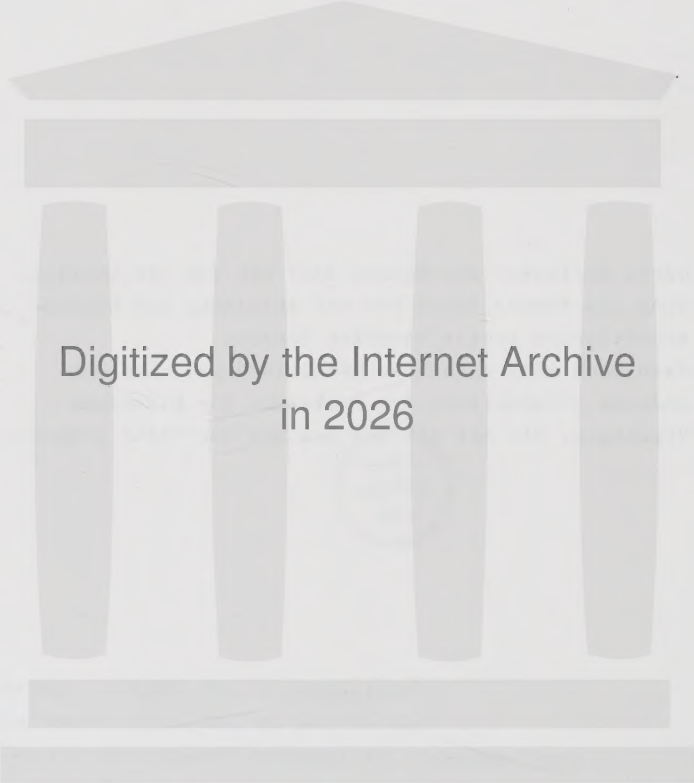
Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. H. zur Hausen

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1976

Herrn Professor zur Hausen darf ich für die Überlassung des Themas sowie für die Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Frau Gabriele Menzel und den anderen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Virologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS UND ZUR IN VITRO-VERMEHRUNG MENSCHLICHER WARZENVIREN

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. Materialien und Beschreibung der Versuche

I. Materialien

1. Nährlösungen, Puffer, Chemikalien
2. Geräte

II. Beschreibung der Versuche

1. Zellkulturen
2. Aufbereitung des infektiösen Materials
3. Beimpfen der Zellkulturen
4. Züchtungsbedingungen
5. Indirekte Immunfluoreszenz
6. Thymidinmarkierung
7. TCA-Fällung
8. Virusreinigung
9. Extraktion von DNS aus Tumorgewebe
10. Extraktion und Reinigung viraler DNS
11. DNS-Extraktion nach Hirt
12. Transkription von viraler DNS
13. Hybridisierung
14. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

C. Ergebnisse

1. Reinigung des Virus und Transkription viraler Nukleinsäure
2. Hybridisierung von zellulärer DNS mit Warzenvirus-cRNS
3. Versuche zur Vermehrung des Warzenvirus in der Gewebekultur

D. Diskussion

E. Literaturverzeichnis

F. Lebenslauf

hende Charakterisierung der auslösenden Erreger. Zwar wurden Papillomviren als kleine desoxyribonukleinsäurehaltige Viren (Durchmesser circa 50 nm) erkannt und ihre Nukleinsäure als zirkuläres Doppelstrangmolekül von einem Molekulargewicht von $4,9 \times 10^6$ Daltons identifiziert, die weitere Analyse viraler Eigenschaften scheiterte jedoch zumeist an dem Unvermögen, diese Agentien in der Zellkultur zu vermehren. Insbesondere blieb die Frage offen, ob die verschiedenen menschlichen Papillomformen, die mit solchen Viren in Verbindung gebracht werden, durch ein und dasselbe Agens hervorgerufen werden, oder ob es beim Menschen eine Gruppe humanpathogener Papillomviren gibt. Verrucae vulgares, Plantarwarzen, verrucae planae juveniles, spitze Kondylome, (Zusammenfassung Rowson und Mahy), epidermodysplasia verruciformis (Ruiter und van Mullem 1970), und Larynxpapillome (Boyle et al. 1973, Kleinsasser und Cruz 1973) wurden inzwischen als Papillomvirus-bedingt erkannt. Obwohl frühere Übertragungsversuche von Ultrafiltraten spitzer Kondylome und von Larynxpapillomen nach Inokulation in die Epidermis Freiwilliger typische Warzen hervorriefen (Waelsch 1918, Ullmann 1923, Serra 1924, Ishikawa 1936, Goldschmidt und Kligman 1958), blieb ungeklärt, ob hier verschiedene Agentien eine histologisch einheitliche Antwort hervorriefen, oder ob die zuvor genannten Tumoren auf Grund eines spezifischen lokalen Responses nach Infektion durch den gleichen Erreger ihr charakteristisches Erscheinungsbild aufwiesen.

Da sowohl spitze Kondylome als auch Larynxpapillome sowie länger bestehende Warzen bei epidermodysplasia verruciformis gelegentlich maligne entarten (zur Hausen et al. 1976, zur Hausen 1976), ohne daß man in den bösartigen Tumoren dann Viruspartikel nachweisen kann, ist es sicherlich von besonderem Interesse, die Rolle dieser Viren für den Entartungsprozess näher zu analysieren.

Im Folgenden wurde der Versuch unternommen, Warzenvirus aus menschlichen Warzen zu extrahieren und - nach Isolierung seiner DNS - diese mit Hilfe eines bakteriellen Enzyms - der Escherichia coli RNS-Polymerase - in eine hochradioaktive Ribonukleinsäure zu transkribieren. Mit dieser RNS sollten neben verschiedenen Papillomen eine Reihe von weiteren malignen Tumoren auf das Vorhandensein von Warzenvirus-DNS über Nukleinsäurehybridisierung getestet werden.

Darüberhinaus war vorgesehen, Untersuchungen über die Vermehrung von Papillomviren in der Zellkultur vorzunehmen. Das Ergebnis legt nahe, daß beim Menschen mindestens zwei verschiedene Papillomvirustypen existieren. Gleichzeitig erweist es sich weiterhin als außerordentlich schwierig, zu einer Vermehrung von Papillomviren in der Gewebekultur zu kommen.

B.I. MATERIALIEN

1. Nährlösungen, Puffer, Chemikalien

MEM, minimal essential medium nach Eagle (1959), von der Firma Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Y., USA.

Trypsin nach Rous und Jones (1916), von Difco, Detroit, USA.

Hank's Salzlösung nach Vorschrift im Institut zubereitet (Hank 1949).

Rinderseerumalbumin, von der Firma Armour Pharmaceuticals Co., Chicago, USA.

PPO (2,5-Diphenyloxazol) und POPOP (1,4-Bis-5-Phenyl-oxazolyl-2(2)-benzol) von der Firma Knight Laboratories.

Triton X-100 der Firma Röhm & Haas, Frankfurt/Main.

Fluorescein-isothio-cyanat, Nr. 3994, Firma Merck, Darmstadt.

Tritium-markierte Verbindungen von The Radiochemical Center, über Amersham Buchler, Frankfurt/Main.

Fluorescein-markiertes anti-human-gamma-Globulin der Firmen Nordic, Tilburg, über Travenol, München.

Nitrozellulosefilter mit niederem Acetatanteil (0,45 µ Porenweite) der Firma Sartorius, Göttingen.

Visking Dialyseschlauch der Firma Union Carbide, Chicago, USA.

Cäsiumchlorid und Pronase P der Firma Serva, Heidelberg.

Kälberserum der Firma Flow Laboratories, Bonn.

SDS (Natrium-dodecylsulfat) der Firma Merck, Darmstadt.

Genetron (1,1,2-Trichlor-trifluoräthan) der Firma Fluka AG, Buchs, Schweiz.

Szintillator: Toluol Szintillator (nur für getrocknete Filter) 30 g PPO, 1 g POPOP und 10 l Toluol.

Trichlor-essigsäure: (TCA) 10 beziehungsweise 5 %ige Lösungen in H₂O und 100 mMol Lösung von Natriumpyrophosphat (Tetranatriumdiphosphat) wurden angesetzt

und bis zum Gebrauch bei 4° C aufbewahrt. Neun Teile der 10 beziehungsweise 5 %igen TCA-Lösung wurden mit einem Teil Pyrophosphat-Lösung gemischt.

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung): Dulbecco und Vogt, 1954. Für 1 l PBS wurden 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 0,2 g KH_2PO_4 in 800 ml H_2O , 0,167 g $\text{CaCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml H_2O und 0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml H_2O angesetzt, und die MgCl_2 beziehungsweise (bzw.) CaCl_2 -Lösungen langsam zu der Lösung der restlichen Salze gerührt.

SSC: Es wurde vor Gebrauch durch Verdünnen aus einer 20 x SSC-Lösung hergestellt. 20 x SSC: 3 Mol NaCl, 0,3 Mol Na-citrat.

Millonig Puffer: 2,26 % $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 2,52 % NaOH, 5,4 % Glukose. Zuerst gaben wir $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und NaOH zusammen, dann fügten wir die Glukose hinzu.

Osmiumsäure: 1 %ig, 100 mg Osmiumoxid wurden in 10 ml Millonigpuffer gelöst.

Durcupan I : Ansatz der Komponenten A, B, D, (A = Epoxyharz, B = Härter, D = Weichmacher): 20 ml A + 20 ml B + 0,3 ml D.

Durcupan II.: Ansatz der Komponenten A,B,D,C (C = Beschleuniger): 20 ml A + 20 ml B + 0,3 ml D + 0,7 ml C. Durcupan wurde über die Chemische Fabrik Fluka AG, Buchs SG, Schweiz bezogen.

Uranylacetat: Es wurde eine in 50 %igem Alkohol gesättigte Uranylacetat-Lösung hergestellt, die dann über 15 Minuten geschüttelt und anschließend filtriert wurde.

Bleicitrat: 1,33 g Pb-Nitrat wurden in 15 ml frischem destilliertem Wasser aufgelöst. Getrennt davon wurden 1,76 g Na-Citrat in 15 ml frischem destilliertem Wasser gelöst. Nach Zusammengeben beider Lösungen in einen 50 ml Erlenmeyerkolben, blieben diese 30 Minuten stehen, wobei sie zwischendurch geschüttelt wurden. Anschließend erfolgte Zugabe von 8 ml NaOH (1 normal). Die Lösung

solche sich dann klären. Mit diesem suspendierten Wasser wurde gut gemischt und der pH-Wert auf 12 eingestellt. Vor Gebrauch wurde zentrifugiert (5000 Umdrehungen min für 10 Minuten).

Masse und Masse von *Saxa Helicolen*

Spermidin von *Saxa Helicolen*

Formamid von der Firma Merck, Darmstadt.

Alle anderen verwendeten Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt.

2. Geräte

Mikroskop: umgekehrtes Leitz Mikroskop Navars, Leitz Orthoplan, ausgerüstet mit Phasenkontrast nach Gerthke und Flehm, Opt. Artillerie-Flusschneise.

Elektronenmikroskop: Zeiss EM 10

Refraktometer: von Leitz

Salzfraktionsselekt: Tysano III, Firma Beckman, Frankfurt, Main.

Spektrophotometer: Zeiss PMQ II und Gelford 240.

Fluoreszenztrifuge: Beckman L 240

Vielfach Filtrationsgerät: Firma Helzel, Dordan.

Zentrifugen: Loris II, III S und Loris Kossilowka S.

Schüttelgeräte: Firma Kistermann, Dordburg.

B.II. Beschreibung der Versuche

1. Zellkulturen

a) Primäre Zellen

Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK - human embryonic kidney) präparierten wir aus menschlichen Föeten. Die Nieren wurden sorgfältig vom Bindegewebe befreit, anschließend in kleine Stücke geschnitten und circa 30 Minuten in 0,25 %iger Trypsinlösung mit Phosphatpuffer bei 37° C gerührt. Die isolierten Einzelzellen wurden durch ein Gazetuch filtriert, abzentrifugiert und in Nährmedium (MEM mit 10 % foetalem Kälberserum) ausgesät. In der Regel wuchs ein dichter Zellrasen drei bis vier Tage nach der Aussaat auf dem Boden des Kulturgefäßes.

b) Permanente Zellen

Eine etablierte Zell-Linie aus Nierenzellen amerikanischer grüner Meerkatzen (Vero) wurde in diese Versuche miteinbezogen. Diese Zellen wachsen als epithelialer Zellrasen auf dem Boden der Kulturgefäße und können jeweils wenige Tage nach der Aussaat durch Behandlung mit 0,25 %igem Trypsin suspendiert und auf neue Gefäße ausgesät werden. In der Regel werden sie im Verhältnis 1:3 weitervermehrt.

2. Aufbereitung des infektiösen Materials

Warzen und andere Papillome erhielten wir durch die Hilfe der Dermatologischen Universitätsklinik und der Hals-Nasen-Ohrenklinik, Erlangen. Die Papillome wurden in dem Institut für Klinische Virologie von der umgebenden Haut befreit und dann mit einer kleinen Schere feingeschnitten. Wir gaben dazu noch ungefähr 2 ml Medium MEM und etwa 2-3 g Seesand und zerrieben das erhaltene Gemisch in einem Mörser. Nach anschlies-

sender Zentrifugation über 20 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute (U/min) wurden mit dem resultierenden Überstand die Zellkulturen infiziert.

3. Beimpfen der Zellkulturen

Ein Milliliter (ml) des infektiösen Materials wurde auf eine 250 ml Vierkantflasche gegeben (bzw. 2 ml auf eine 1000 ml Roux-Flasche), in denen ein einheitlicher Zellrasen ausgewachsen war. Kontrollkulturen erhielten 1 bzw. 2ml MEM-Medium. Während der Adsorptionszeit von eineinhalb Stunden wurden die Flaschen alle zehn Minuten geschwenkt, um das Austrocknen eines Teiles des Zellrasens und damit einen eventuellen unspezifischen zytopathogenen Effekt zu vermeiden. Während der Adsorptionsphase verblieben die Flaschen bei Zimmertemperatur.

4. Züchtungsbedingungen

Nach der Adsorptionszeit pipettierten wir in jede Vierkantflasche 25 ml Kulturmedium (100 ml in die Rouxflaschen). Dieses setzte sich zusammen aus: 450 ml MEM-medium, 2,2 g NaHCO_3 , 50 ml Kälberserum, 100 $\mu\text{g/ml}$ (μ = Mikro) Streptomycin, 100 E/ ml (E = Einheiten) Penicillin, 40 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin und 80 $\mu\text{g/ml}$ Nystatin. Die Zellkulturen wurden dann in einem Brutschrank bei entweder 27°, 30°, oder 32° C inkubiert und blieben dort bis zum achten bzw. zwölften Tag nach Beimpfung. Die Temperaturen unter 37° C wählten wir einerseits, weil Vorversuche gewisse Anhaltspunkte für eine Virusvermehrung bei niedrigen Temperaturen ergeben hatten. Andererseits hatten wir festgestellt, daß 27° C noch ein ausreichend gutes Gedeihen der Vero-Zellkulturen garantiert.

5. Indirekte Immunfluoreszenz

Objektträger wurden mit Methanol gereinigt, um eventuell dort befindliches Fett abzulösen. Dann wurden sie in Petrischalen gelegt (Durchmesser 8,5 cm) und darin sterilisiert. Mit Virus beimpfte Zellen wurden abtrypsiniert und in eine solche Petrischale pipettiert. Dazu wurden 25 ml Kulturmedium gegeben und die Petrischale über Nacht in einen offenen Exsikkator in den 37° C CO₂- Brutschrank (10 Vol. % CO₂) gestellt, da die Zellen dort leichter anwuchsen. Am folgenden Morgen verschlossen wir den Exsikkator luftdicht und beließen ihn zwei Tage bei 30° C. Die bewachsenen Objektträger wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und mit Azeton fünf bis sechs Minuten fixiert. Die fixierten Präparate blieben bis zu ihrer Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

Seren von Warzenträgern wurden 1:5 bzw. 1:10 mit PBS verdünnt und auf die bewachsenen Objektträger gegeben. Nachdem wir sie dort eine Stunde lang bei 37° C in feuchter Atmosphäre hatten einwirken lassen, wuschen wir die Präparate in einer Schale zweimal fünf Minuten mit jeweils 250 ml PBS. Die Objektträger wurden mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- gekoppeltem Antihumangammaglobulin (Behring-Werke, Marburg) in einer Verdünnung von 1:40 bis 1:80 behandelt.

6. Thymidinmarkierung

Auf je 100 ml Medium gaben wir 1 µc/ml H³- Thymidin, spezifische Aktivität ca. 20 Ci/mMol . Zwölf Tage nach der Infektion wurden die Zellkulturen in den Flaschen dreimal eingefroren und langsam aufgetaut, um die Zellen aufzubrechen und so möglichst viel Virus frei zu setzen. Anschließend zentrifugierten wir den Zelldebris bei 3000 U/min 20 Minuten lang ab und gaben

den Überstand für 70 Minuten in die Ultrazentrifuge bei 21.000 U/min im SW 27 Rotor. Das abzentrifugierte Sediment resuspendierten wir mit 5 ml PBS, stellten mit CsCl die Dichte auf 1,34 g/ml ein und ließen die Proben für 40 Stunden im SW 56 Rotor bei 35.000 U/min zentrifugieren. Der so entstandene Gradient wurde anschließend sofort in Fraktionen von je drei Tropfen gesammelt und 5 oder 10 µl einer Fraktion nach Zusatz von 10 ml Szintillator im Szintillationszähler vermessen.

7. Trichloressigsäure-Fällung

Die radioaktiven Proben wurden im Eisbad vorgekühlt und pro Fraktion mit einem Tropfen einer 0,1 %igen BSA-Lösung (Rinderserumalbumin) und 0,7 ml 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Dieses Gemisch ließen wir 30 Minuten im Kühlschrank (4° C) stehen. Anschließend wurden die Lösungen durch Membranfilter (Porengröße 0,45µ) filtriert. Zuvor waren diese in 5%iger TCA-Lösung eingeweicht worden. Nach der Filtration wurden die Filter zweimal mit je 50 ml 5 %iger TCA gewaschen und dann sofort in 10 ml PPO/ POPOP Triton X 100 getaucht. Nach dem Schütteln der Röhrchen über 60 Minuten (Kottermann Stufe 10) wurde die Radioaktivität gemessen.

8. Virusreinigung

Individuelle Warzen wurden mit der Schere kleingeschnitten, mit Seesand zerrieben und zum Teil mit gleicher Menge Genetron behandelt. Dieses Gemisch homogenisierten wir nachher bei Höchstgeschwindigkeit im Sorvall-Homogenisator und zentrifugierten das erhaltene Material 150 Minuten lang über ein CsCl-Kissen (1 ml $\rho = 1,422 \text{ g/cm}^3$) bei 30.000 U/min im SW 50.1-Rotor (Dulbecco und Voigt 1963). Sichtbare Banden wurden durch Austropfen isoliert,

resuspendiert und die Dichte mit CsCl auf 1,34 g/ml eingestellt. Ein Ultrazentrifugenlauf wurde bei 35.000 U/min über 20 Stunden im SW 50.1 Rotor wiederholt. Anschließend dialysierten wir sichtbare Banden zweimal gegen 300 ml 0,1 molaren Trispuffer, der ein pH von 7,2 zeigte. Das Dialysat wurde danach im Elektronenmikroskop nach Viruspartikeln durchsucht. In einem Teil der Versuche wurde die Genetron-Behandlung unterlassen.

9. Extraktion von DNS aus Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde mit Seesand im Mörser unter Zusatz von 0,1 molarem (M) Trispuffer zerrieben. Wir füllten das Gemisch bis auf 4 ml mit 0,1 M Trispuffer auf und fügten dann 1 ml 5 %iges SDS hinzu. Die nach Austritt der Nukleinsäuren in der Regel visköse Präparation wurde dann Phenol-extrahiert, das heißt auf einen Ansatz von nun 5 ml wurden 5 ml Phenol zupipettiert und die Lösung ungefähr zwei Minuten geschüttelt. Damit fällten wir die Proteine aus. Anschließend wurde bei 2000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde von der Phenolphase mit Hilfe von Pasteurpipetten getrennt. Dieser Vorgang der Phenolextraktion wurde noch einmal wiederholt. Wir füllten die wässrige Phase in Dialyseschläuche und dialysierten sie gegen zwei Liter 0,1 M x SSC. Die RNS wurde dann durch RNase, die zuvor über 10 Minuten auf 80° C erhitzt worden war, bei 37° C 30 Minuten lang verdaut. Dabei gaben wir 20 µg RNase auf 1 ml Probe. Nach einer weiteren Phenolausschüttelung und Dialyse konnten wir die DNS im Photometer vermessen. Aus der optischen Dichte errechneten wir die Konzentration der DNS (1 optische Dichteeinheit entspricht circa 50 µg DNS).

10. Extraktion und Reinigung viraler DNS (Tai et al. 1972)

Zu 1,2 ml der Virussuspension wurden 0,3 ml einer 5 %igen

SDS-Lösung gegeben, um eine End-SDS-Konzentration von 1 % zu erreichen. Dieses Gemisch inkubierten wir zehn Minuten bei 37° C in der Absicht, die Viruskapside aufzubrechen. Durch Zugabe von 0,253 g CsCl und Stehenlassen bei 0° C wurde das SDS ausgefällt. Die SDS-Flocken wurden bei 3000 U/min 15 Minuten lang abzentrifugiert. Zur Trennung vertwisteter zirkulärer DNS (Komponente I) von zirkulärer DNS mit Einzelstrangbrüchen (Komponente II) und von linearer DNS (Komponente III) wurde ein interkalierender Farbstoff - Ethidiumbromid - zugesetzt, der die Dichte der DNS je nach Sekundärstruktur verändert (Radloff et al. 1967). Wir gaben 1 mg Ethidiumbromid (200 µg/ml) zu, brachten das Volumen mit 0,1 M Trispuffer auf 5 ml und stellten mit CsCl die Dichte auf 1,55 g/ml ein. Schließlich wurde mit 0,5 ml Paraffinöl überschichtet, um den Gradienten beim Lauf über 40 Stunden bei 38.000 U/min und 20° C im SW 50,1 Rotor gegen Verdunstung zu schützen. Wir sammelten Fraktionen zu je drei Tropfen.

11. DNS-Extraktion nach Hirt (Hirt 1967)

Plantarwarzen wurden zermörsert, 5 %iges SDS (1 ml auf 4 ml Probe) und Pronase (100 µg/ml) wurden hinzugefügt und die Mischung bei 37° C 30 Minuten stehengelassen. Dann brachten wir den Ansatz mit NaCl auf die Konzentration von 1 Mol und stellten ihn über Nacht in den Kühlschrank. Hierbei kommt es zur Aussalzung größerer DNS-Moleküle. Am nächsten Tag wurde das Material bei 20.000 U/min bei 4° C zehn Minuten lang zentrifugiert und der Überstand über vier Stunden gegen 0,1 x SSC dialysiert, wobei jeweils fünf Liter Dialyseflüssigkeit zweimal gewechselt wurden. Es schloß sich eine Phenolausschüttelung an. Das in der Probe zurückgebliebene Phenol wurde mit Äther ausgeschüttelt. Den Äther wiederum bliesen wir mit Stickstoff aus. Nun setzten wir RNase zu (20 µg/ml DNase-frei) und inkubierten

30 Minuten bei 37° C. Dann erfolgte eine erneute Phenol-, Äther- und Stickstoffbehandlung. Die Probe wurde lyophilisiert, um sie schließlich mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 0,25 ml zu bringen. Im SW 50.1 Rotor zentrifugierten wir bei einer Dichte von 1,50 g/ml vier Stunden lang bei 35.000 U/min. Pro Gradient sammelten wir 30 Fraktionen.

12. Transkription von viraler DNS

Diese Methode entspricht mit einigen Modifikationen dem Ansatz von Burgess (Burgess 1969).

Im Ansatz waren 6 µg Warzenvirus-DNS, gelöst in 0,2 ml 0,1 M x SSC, 40 nM der vier Nukleosidtriphosphate im Gesamtvolumen von 40 µl (ATP, GTP und H³ CTP spezifische Radioaktivität 20,6 Ci/mM, H³ UTP spezifische Radioaktivität 15 Ci/mM), 20 µl Polymerase in 50 %igem Glycerin, 10 µl Spermidin. (1 µl = 1 µl) Der Puffer, in dem die Transkription vorgenommen wurde (Transkriptionspuffer) enthielt 0,04 M Tris (pH 7,7), 0,01 M MgCl₂, 0,1 mM Dithiothreitol, 0,2 M KCl, 50 mg/100 ml RSA (RNase frei), 0,4 mM K₂HPO₄ und wurde in kleinen Mengen bei - 20° C eingefroren und nach Bedarf aufgetaut.

Zur Transkription wurden 40 nM der beiden radioaktiven Triphosphate CTP und UTP, die als 50 %ige alkoholische Lösung mit 1 %igem (NH₄)₂CO₃ vorlagen, direkt im Reaktionsgefäß lyophilisiert. Zehn Mikroliter einer Lösung von 40 nM ATP und GTP in Transkriptionspuffer wurden zupipettiert. Außerdem gaben wir 10 µl einer Lösung von 120 mM Spermidin gelöst in Transkriptionspuffer und 6 µg Warzenvirus-DNS zu. Das Volumen des Transkriptionsansatzes wurde mit Transkriptionspuffer so eingestellt, daß es nach Zugabe von 20 µl Polymeraselösung in 50 %igem Glycerin 0,6 ml betrug. Siebzig Minuten nach dem Start der Transkription (bei 37° C) wurde die

Reaktion durch Zugabe von 0,6 ml DNase (50 µg), die wir 30 Minuten bei 37° C einwirken ließen, gestoppt. Wir schlossen eine Ausschüttelung mit doppelt destilliertem Phenol an und zentrifugierten zehn Minuten bei 2500 U/min ab. Nach dem Aufbringen des Überstandes auf eine Sephadex-Säule (G 50-fine), vereinigten wir die Fraktionen des ersten Radioaktivitätsgipfels und hybridisierten das erhaltene Material zur Kontrolle mit Warzenvirus-DNS. (Hybridisierung siehe B.II.13)

Die erhaltene komplementäre Radioaktive RNS (c-RNS) wurde zu je 10⁶ cpm (radioaktive Impulse) lyophilisiert und bei -20° C aufbewahrt. Ihre spezifische Aktivität betrug circa 18 x 10⁶ cpm/µg.

13. Hybridisierung (zur Hausen et al. 1972)

Jeweils 50 µg zellulärer DNS setzten wir in eine Hybridisierungsreaktion ein. Von der radioaktiven c-RNS wurden in der Regel 100.000 cpm zugegeben. Wir verdünnten die DNS jeweils mit 0,1 M x SSC auf ein Volumen von 4 ml, denaturierten sie in kochendem Wasser über 15 Minuten und schreckten sie in Eis ab. Kurz bevor sie auf die Filter (0,45 µ) kam, wurde 1 ml 10 M x SSC zupipettiert und damit die Konzentration auf 2 M x SSC eingestellt. Die einzelsträngigen DNS-Moleküle wurden an Nitrozellulosefilter durch langsames Filtrieren gebunden. Dann gaben wir diese Filter in Szintillationsgefäße und inkubierten sie vier Stunden lang bei 80° C. In der Zwischenzeit wurde die c-RNS (1 Ampulle 10⁶ cpm) mit 0,1 M x SSC auf einen Milliliter verdünnt und schließlich zehn Minuten lang bei 100° C ebenfalls denaturiert. Auch sie schreckten wir in Eis ab und pipettierten dann je 0,1 ml c-RNS und 0,9 ml 50 %iges Formamid in 2,6 M x SSC auf die getrockneten Filter.

Die Reaktion wurde über sechs Tage im Wasserbad bei 45° C durchgeführt. Am siebten Tag schwenkten wir die Filter

in je drei Töpfen a 250 ml 2 x SSC und legten sie dann auf eine Fritte, wo sie je zweimal mit 50 ml 2 M x SSC von beiden Seiten gewaschen wurden. Die folgende RNase-Verdauung (20 µg/ml RNase auf 5 ml 2 M x SSC) führten wir in neuen Szintillationsgefäßen durch. Sie dauerte 30 Minuten und erfolgte bei Zimmertemperatur. Anschließend schwenkten und wuschen wir die Filter erneut, trockneten sie in neuen Szintillationsgefäßen bei 80° C eine halbe Stunde lang und pipettierten schließlich jeweils 10 ml PPO/ POPOP Szintillator hinzu. Die hybridisierte cRNS ließ sich aufgrund der gebundenen Radioaktivität im Szintillationszähler auswerten.

14. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Wie oben beschrieben, wurden die Kulturen dreimal bei -20° C eingefroren, langsam wieder aufgetaut und der Zelldebris abzentrifugiert. Den Überstand verwendeten wir einerseits zum Überimpfen, andererseits wurde ein Teil im SW 27 bzw. SW 25.1 Rotor bei 21.000 rpm (U/min) sedimentiert. Das in kleinem Volumen (0,5 ml) resuspendierte Material wurde schließlich mit der Methode des "negative staining" durch 2 %ige Phosphorwolframsäure kontrastiert, und die Präparate im Elektronenmikroskop betrachtet.

Daneben fertigten wir auch Dünnschnitte der infizierten Kulturen an. Dazu wurde der Zellrasen trypsiniert und die Zellen in einem Zentrifugenlauf (2,500 U/min) sedimentiert. Wir vermischten das Zellsediment vorsichtig mit 2 %igem flüssigem Agar und fixierten in 2 %igem Glutaraldehyd über Nacht. Der Agarzellblock wurde auf Stücke von 1 mm x 1 mm Größe zerkleinert, und diese 30 Minuten bei dreimaligem Wechsel in Millonigpuffer gewaschen. Über eine Stunde bei 4° C wurde das Material in 1 %iger Osmiumsäure (in Millonigpuffer) ein zweites Mal fixiert und wieder gewaschen.

Wir entwässerten die Proben in einer aufsteigenden Reihe Azeton (50, 75, 95, 100 %), zweimal mit Propylenoxid für jeweils mindestens 15 Minuten, und betteten sie in Kunstharz Durcupan I und II.

1. Arbeitsgang: drei Teile Propylen, ein Teil Durcupan I., 30 Minuten 50° C.
2. Arbeitsgang: zwei Teile Propylen, zwei Teile Durcupan I., 30 Minuten 50° C.
3. Arbeitsgang: ein Teil Propylen, drei Teile Durcupan I., 30 Minuten 50° C.
4. Arbeitsgang: reines Durcupan I., 60 Minuten 50° C.
5. Arbeitsgang: reines Durcupan II., 60 Minuten 50° C.

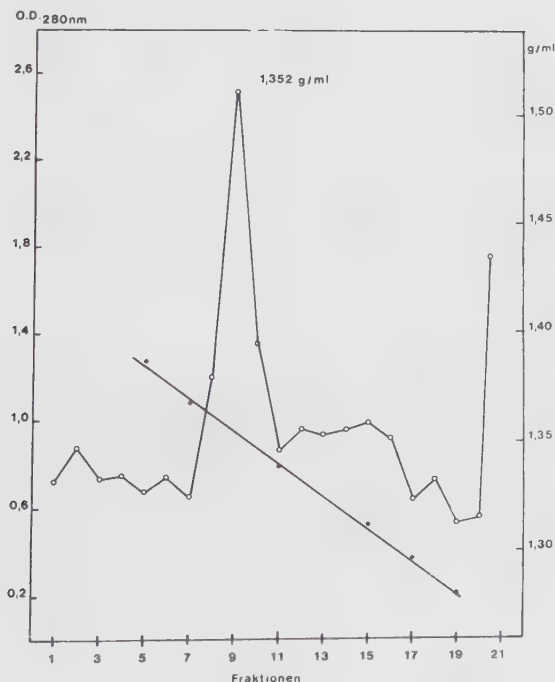
Schließlich brachten wir das so aufbereitete Material in Gelatinekapseln, füllten diese mit Durcupan II. auf, und ließen sie drei Tage bei 60° C polymerisieren. Die Proben wurden noch zwei Tage bei Zimmertemperatur belassen. Anschließend wurden Ultradünnschnitte mit dem Reichert Ultramikrotom angefertigt, die auf einer Wasseroberfläche aufgefangen und auf Metallnetze (mesh 400) aufgetupft wurden. Bevor wir diese im Elektronenmikroskop betrachten konnten, kontrastierten wir sie mit Uranylazetatlösung über 20 Minuten bei Zimmertemperatur. Dann wuschen wir die Proben in frisch destilliertem Wasser. Wir ließen sie noch eine Stunde trocknen, bevor sie im Elektronenmikroskop betrachtet wurden.

C. Ergebnisse

1. Reinigung des Virus und Transkription viraler Nukleinsäure

Plantarwarzen und verrucae vulgares wurden zur Reinigung von Viruspartikeln herangezogen. Die Bearbeitung erfolgte wie unter "Material und Methoden" beschrieben. Mit der in B II. 8 beschriebenen Virusreinigung mit Hilfe von Genetron konnten wir keine Viruspartikel isolieren. Auch die von Hirt beschriebene Methode der Virus-DNS-Reinigung zeigte keine befriedigenden Resultate. Wir konnten nur aus jeder fünften bis siebten Plantarwarze ausreichend Viruspartikel für weitere Versuche isolieren, während dies bei verrucae vulgares überwiegend nicht möglich war. Bei dieser Reinigung bandete das Virus im CsCl-Gradienten bei einer Dichte von 1,352 g/ml (Abbildung 1.)

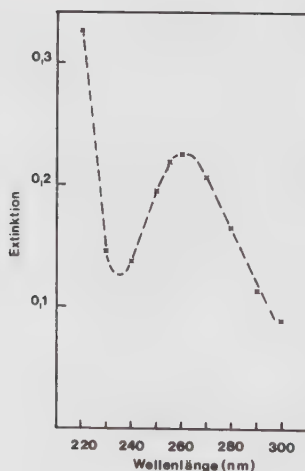
Abbildung 1.



Die Virus-haltigen Fraktionen wurden dialysiert. Anschließend wurde die DNS im CsCl-Ethidiumbromid-Gleichgewichtsgradienten isoliert. Dabei erwies sich, daß die Komponente I der Warzenvirusnukleinsäure als scharfe, sichtbare Bande bei einer Dichte von 1,60 g/ml nachweisbar war, während Komponente II und III als etwas diffusere Bande bei einer Dichte von 1,55 g/ml zu finden waren.

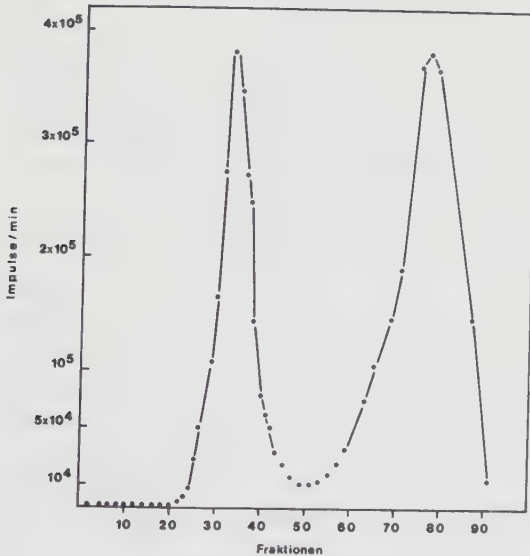
In einem weiteren Arbeitsgang wurde nach entsprechender Dialyse die optische Dichte der Komponente I bestimmt und das optische Spektrum vermessen (Abbildung 2.).

Abbildung 2.



Dann erfolgte die Transkription der viralen Nukleinsäure mit Hilfe der *Escherichia coli*-RNS-Polymerase. Nach Inkubation des Transkriptionsgemisches und anschließender DNase-Behandlung wurde die komplementäre RNS über eine Sephadex G 50-Säule eliminiert. Das Elutionsprofil zeigt Abbildung 3. Etwa 33% der eingesetzten Nukleosidtriphosphate sind in die c-RNS eingebaut.

Abbildung 3.



2. Hybridisierung von zellulärer DNS mit Warzenvirus-cRNS

Es sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob verschiedene menschliche Papillome, in denen Warzenviruspartikel nachgewiesen werden können (zum Beispiel Plantarwarzen, verrucae vulgares, spitze Kondylome (condylomata acuminata), und Larynxpapillome) mit der c-RNS unseres Virus-

isolates hybridisierten. Zu diesem Zweck wurde die DNS der entsprechenden Tumoren extrahiert und zu jeweils 50 µg DNS mit c-RNS hybridisiert. Das Ergebnis zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1.

Labornummer	Warzentyp	hybridisierte Impulse
WV-10	Plantarwarze	14
WV-47	"	2436
WV-50	"	8413
WV-53	"	11593
WV-54	"	25834
WV-15	verruca vulgaris	18
WV-34	"	143
WV-79	"	397
WV-92	"	19
WV-93	"	50
WV-96	"	5
WV-97	"	91
WV-98	"	99
WV-104	"	813
WV-12	seborrhoische Warzen	28
WV-73	"	29
WV-11	spitze Kondylome	27
WV-19	"	53
WV-35	"	20
WV-67	"	24
WV-69	"	19
WV-75	"	25

Labornummer	Warzentyp	hybridisierte Impulse
WV-94	spitze Kondylome	16
WV-114	"	21
WV-41	Larynxpapillome	4
WV-83	"	14
WV-88	"	19
WV-112	Subglottispapillom	24
WV-113	Ohrmuschelpapillom	33
WV-116	Nasenpapillom	23
WV-118	Gehörgangspapillom	25
negative Kontrolle: HEL-zellen		33

Diese Ergebnisse zeigen, daß offensichtlich nur ein Teil der Plantarwarzen und der verrucae vulgares mit der radioaktiven Nukleinsäure hybridisierten. Interessanterweise erwiesen sich alle spitzen Kondylome und weitere gutartige Papillomformen unter diesen Bedingungen als negativ für Warzenvirus-DNS.

In einem weiteren Ansatz wurde die Hybridisierung von Warzenvirus-c-RNS mit der DNS verschiedener zusätzlicher gut- und bösartiger Tumoren getestet. Tabelle 2. zeigt das Ergebnis. Die Analyse der malignen Tumoren ergab somit keinen Anhalt für das Vorliegen von Warzenvirus-DNS in den Tumorzellen. Auffallend ist jedoch die offensichtlich positive Reaktion im Falle des einen Glomustumors WV-62). Da uns leider kein zusätzliches Material zur Verfügung stand, konnten wir die Frage nicht abklären, ob

solche Tumoren regelmäßig Virusnukleinsäure enthalten und damit vielleicht andere Manifestationsformen der Warzenvirusinfektion darstellen. Auffallend ist ferner

Tabelle 2.

Labornummer	Tumortyp	hybridisierte Impulse
WV-21	Keratoakanthom	18
WV-68	Morbus Bowen	27
WV-70	"	26
WV-77	Basaliom	27
WV-52	Larynxkarzinom	19
WV-57	submandibuläres Karzinom	23
WV-74	Zungenkarzinom	16
WV-81	Mundbodenkarzinom	28
WV-66	Parotistumor	22
WV-49	Mucosis fungoides	21
WV-62	Glomustumor	171
WV-87	"	37
WV-82	Molluscum contagiosum	296
WV-99	normale Kieferhöhlenschleimh.	21

HEL + 5 ng gereinigte Warzenvirus-DNS(pos. Kontrolle)
9273

die positive Hybridisierung der Molluscum contagiosum-Probe(WV-82). Beim Molluscum contagiosum handelt es sich ja um eine Pockenvirus-bedingte Zellproliferation. Eine nachträglich durchgeführte histologische Untersuchung - freundlicherweise von Herrn Professor Meinhof, Dermatologische Universitätsklinik Erlangen, übernommen - des entsprechenden Materials ergab jedoch, daß es sich hier um den wohl seltenen Fall einer verruca vulgaris und

und eines Molluscum contagiosum im gleichen Material handelte, so daß sich die positive Hybridisierung wohl auf die verruca vulgaris-Komponenten des Gewebes zurückführen läßt.

3. Versuche zur Vermehrung des Warzenvirus in der Gewebekultur

In verschiedenen Ansätzen wurde versucht, Warzenvirus in der Zellkultur zu vermehren. In Analogie zu den natürlichen Wirtszellen versuchten wir vornehmlich epitheliale Zellen (Vero- und HEK-zellen) zu infizieren.

Nachdem Vorversuche einen gewissen Anhalt dafür ergaben, daß möglicherweise Temperatureffekte eine Rolle bei der Vermehrung von Papillomviren spielen, infizierten wir die Zellen bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen. Die infizierten Zellen wurden bei 27°, 30°, 32°, und 37° C inkubiert. Zur Beimpfung wurden Virusisolate aus zwei Plantarwarzen (WV-196, WV-198), die zahlreiche elektronenmikroskopisch darstellbare Viruspartikel enthielten, genommen. Grundsätzlich ließen sich bei allen Inkubationstemperaturen keine drastischen zytopathogenen Effekte nachweisen. In den infizierten Kulturen kam es jedoch besonders bei niedrigen Temperaturen (unter 37° C) zu einem vermehrten Absterben von Zellen und zu einer Häufung von totem Zellmaterial im Überstand. Zytopathogene Veränderungen ließen sich weder durch weitere Trypsinpassagen der infizierten Zellen noch durch Aufbrechen des infizierten Zellmaterials nach jeweils ein- bis zweiwöchiger Inkubation und anschließender Überinfektion von neuen Zellen (Blindpassagen) hervorrufen.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der infizierten Verozellen erlaubte noch nach fünf Blindpassagen (Verdünnung 1:400000) den Nachweis vereinzelter typischer Papillomviruspartikel, die noch nach der ersten und drit-

ten Passage in großer Zahl nachweisbar waren (Abbildung 3_a, 4., 5.). Möglicherweise handelte es sich hier um zell-adsorbiertes Virus, das nicht penetriert war und bei Zerstörung der Zellen freigesetzt wurde. Jedenfalls ließ sich kein sicherer Nachweis für eine Virusvermehrung gewinnen, da in Zellschnitten wohl gehäuft intranukleäre Granula gefunden wurden (Abbildung 6.), nicht jedoch Strukturen, die neusynthetisierten Papillomviren hätten entsprechen können. In der sechsten Passage fanden sich herdförmige, zytopathogene Effekte in den infizierten Verozellkulturen (Abbildung 7.), die sich jedoch nicht in späteren Passagen wiederfinden ließen. Sie konnten in ihrer Ursache nicht aufgeklärt werden. Nach der fünften Passage konnte ich keine Papillomviruspartikel mehr in den weiteren Passagen elektronenmikroskopisch darstellen. Die durchgeführten Thymidinmarkierungen mit anschließenden Virusreinigungsversuchen und Trichloressigsäurefällungen im Bereich der erwarteten Virusbanden ergaben keine reproduzierbaren positiven Ergebnisse. Auch über Immunfluoreszenz-serologische Versuche ließ sich kein Hinweis für eine Virusvermehrung erhalten. Wir testeten vier Seren von Warzenträgern (Plantarwarzen) in den Verdünnungen 1:5 und 1:10.

Abbildung 3a

Vergrößerung:

5 x 31.500

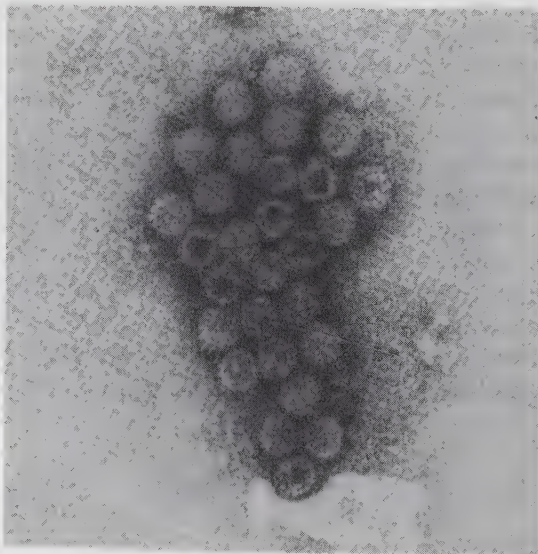
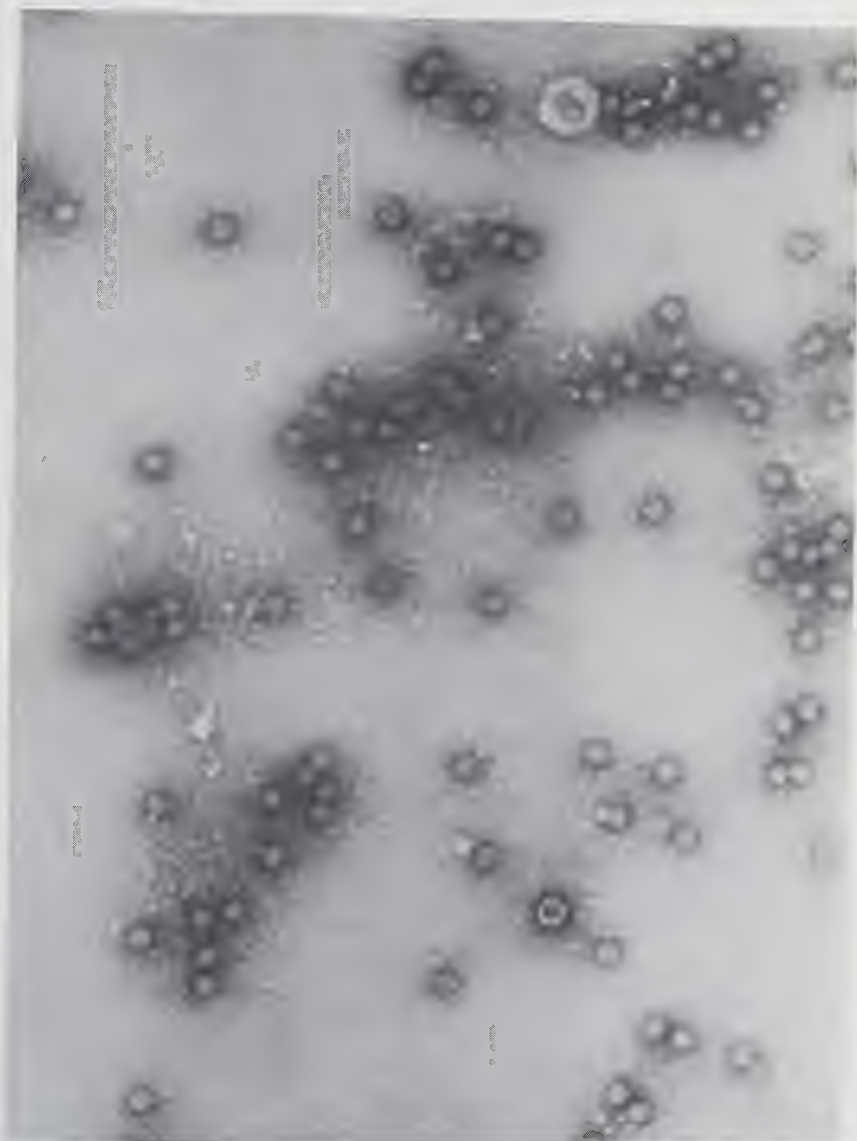


Abbildung 4.



Vergrößerung: 4×20.400

Abbildung 5.

Vergrößerung:

2 x 50.000



Abbildung 7.

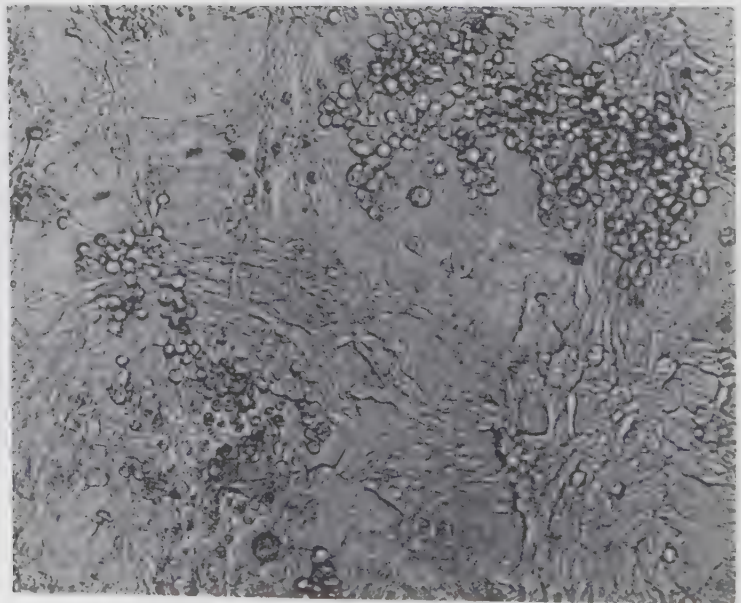
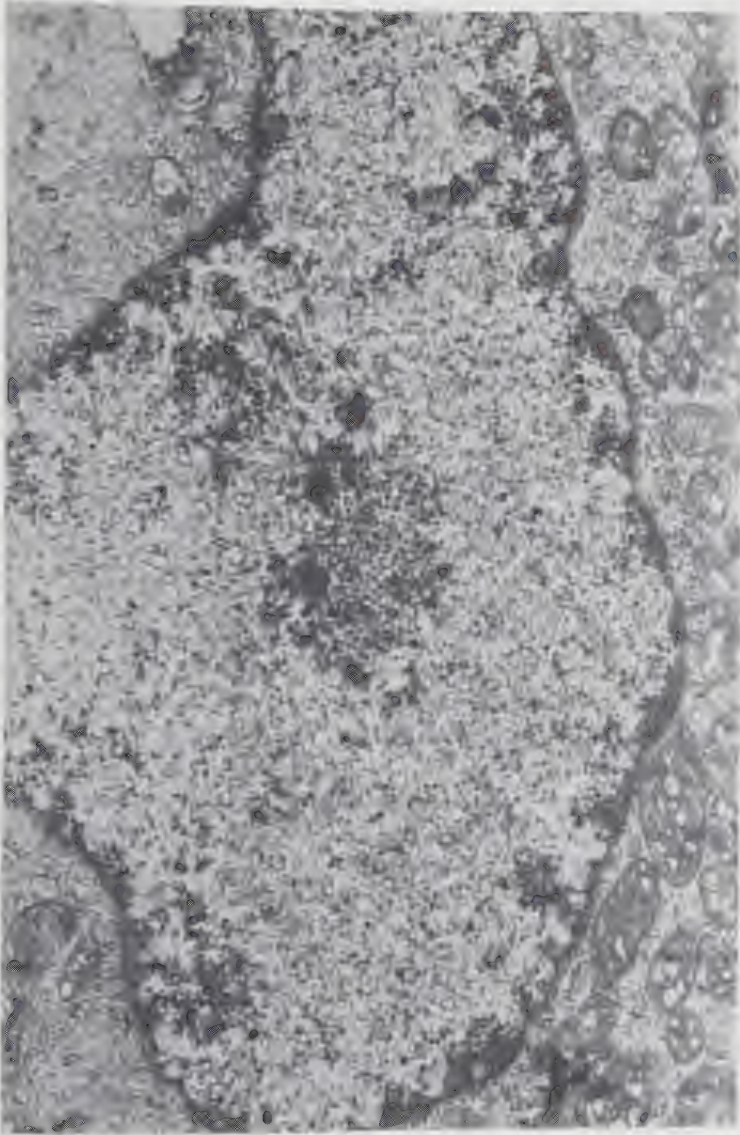


Abbildung 6.



Vergrößerung: 2,5 x 12.500

D. Diskussion

Warzenviren lassen sich bisher nur aus klinischem Material isolieren. Versuche, diese Viren in der Zellkultur zu vermehren, sind in den meisten Fällen fehlgeschlagen (Rowson und Mahy, 1967). Auch erfolgreiche Literaturberichte (Eisinger et al. 1975) haben sich bisher in anderen Laboratorien nicht reproduzieren lassen.

In der vorliegenden Arbeit sollte einmal auf biochemischem Wege Aufschluß über das Vorhandensein von Warzenvirusnukleinsäure in menschlichen Warzen erhalten werden, zum anderen sollte untersucht werden, ob vor allem Temperaturmodifikationen der Gewebekulturbedingungen doch eine Virusreplikation erlauben würden.

Die Reinigung von Warzenpartikeln gelang etwa aus jeder siebten Plantarwarze. Aus verrucae vulgares konnten wir in diesen Versuchen kein Virus isolieren, obwohl elektronenmikroskopisch auch in diesen Papillomen verhältnismäßig leicht Virus nachgewiesen werden kann (Bunting 1953).

Nach Extraktion der DNS aus gereinigten Warzenviruspartikeln wurde die Komponente I in radioaktiv komplementäre RNS transkribiert und diese in Hybridisierungsexperimenten zum Nachweis von Warzenvirus-DNS herangezogen. In vier von fünf DNS-Präparationen aus menschlichen Plantarwarzen gelang es leicht, Virus-DNS in relativ hohen Konzentrationen aufzufinden, eine Plantarwarze war im Bereich der Empfindlichkeit dieses Testes negativ. Versuche aus dem gleichen Institut hatten ergeben, daß die radioaktive RNS-Hybridisierung noch etwa ein virales Genomäquivalent pro Zelle aufzufinden erlaubt (zur Hausen et al. 1974) und damit ein empfindliches Nachweisverfahren darstellt.

Die Hybridisierungsrate der DNS aus verrucae vulgares lag deutlich unter der von Plantarwarzen. Auch hier verhielten sich eine Reihe von Präparaten negativ. Diese

Befunde erlauben folgende Interpretationsmöglichkeiten:

1. Einige Plantarwarzen und verrucae vulgares enthalten nur sehr wenig Virusnukleinsäure. Es wäre denkbar, daß ähnlich den Adenoviren nach Transformation der Zelle nur Fragmente der Virus-DNS in das Wirtszellgenom eingebaut würden (zur Hausen und Sokol 1969).

2. Einzelne Plantarwarzen und verrucae vulgares enthalten bei geringem Virus-DNS-Gehalt quantitativ große Beimengungen von Normalzellen, die kein Virusgenom enthalten. Der dadurch eintretende "Verdünnungseffekt" der Virusgenom-haltigen Zell-DNS würde für den negativen Hybridisierungsausfall verantwortlich sein.

3. Menschliche Warzenviren sind nicht einheitlich. Das negative Hybridisierungsergebnis würde darauf zurückzuführen sein, daß in den entsprechenden Warzen eine andere - nicht komplementäre - DNS eines nicht verwandten Papillomvirustyps vorliegen würde. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen am hiesigen Institut haben in der Tat gezeigt, daß diese Interpretation richtig ist und mindestens vier verschiedene menschliche Papillomvirustypen vorliegen, von denen zwei keinerlei Verwandtschaft miteinander aufweisen (Gissmann und zur Hausen, 1976, Gissmann et al. 1976).

Die Hybridisierungsergebnisse an menschlichen Plantarwarzen und verrucae vulgares gaben somit einen ersten Hinweis auf die Heterogenität humanpathogener Papillomviren.

Überraschenderweise zeigte die DNS weiterer menschlicher Papillome (spitze Kondylome, Larynxpapillome) keine Hybridisierung mit der radioaktiven RNS unseres Warzenvirusisolates. In spitzen Kondylomen und juvenilen Larynxpapillomen lassen sich Viruspartikel - wenn auch nicht so

häufig wie in verrucae vulgares - elektronenmikroskopisch nachweisen (Oriel und Almeida 1970, Boyle et al. 1973, Zimmer 1964, Arnold 1975). Wir deuten unsere negativen Ergebnisse ebenfalls als indirekten Hinweis auf die Heterogenität der Papillomvirusgruppe. Da sich auch die Epidemiologie der Genitalwarzen und Larynxpapillome deutlich von der der übrigen Viruswarzen unterscheidet (zur Hausen et al. 1976) und spitze Kondylome wie auch Larynxpapillome im Gegensatz zu verrucae vulgares gelegentlich maligne entarten (zur Hausen 1976), liegt der Verdacht durchaus nahe, daß es sich hier um unterschiedliche Papillomviren handelt. Leider konnten wir bisher keine Viruspartikel zur direkten Analyse in ausreichender Konzentration aus solchen Tumoren gewinnen.

Bisher durchgeführte Hybridisierungen mit Warzenvirus RNS und der DNS maligner Tumoren erbrachten keine positiven Ergebnisse. Zwar liegen auch keine direkten Hinweise dafür vor, daß Papillomviren an malignen Tumoren beteiligt sind. Dennoch rechtfertigen die eigentümliche Biologie der Papillomviren und ihr "Verschwinden" in transformierten Zellen Untersuchungen über das Vorhandensein von Virusnukleinsäure in verschiedenen Tumorgeweben. Dies gilt insbesondere für Plattenepithelkarzinome, da die "Umwandlung" von Papillomen zum Beispiel bei der Epidermodysplasia verruciformis, den spitzen Kondylomen und Larynxpapillomen zu solchen Karzinomen gelegentlich beobachtet wurde (Übersichtsartikel zur Hausen in Vorbereitung).

Bei einem Tumor, dem Glomustumor wurde eine positive Hybridisierungsreaktion mit der radioaktiven RNS gefunden. Die Signifikanz dieses Befundes bleibt unklar, obwohl auch ein zweiter Tumor eine geringfügige Erhöhung der Hybridisierungsrate aufzuweisen scheint. Es ist nicht auszuschließen, daß im gleichen Lokalisations-

bereich Warzengewebe vorlag, das klinisch nicht diagnostiziert wurde. Hier müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob eine Verbindung zwischen Glomustumor und Warzenvirusinfektion besteht.

Virusvermehrung in der Zellkultur eröffnet in aller Regel Möglichkeiten zur eingehenden Charakterisierung des Agens und zur Untersuchung seiner biologischen Eigenschaften. Trotz zahlreicher Versuche (Rowson und Mahy 1967) war es jedoch bis heute nicht möglich, Papillomviren in der Gewebekultur zu züchten. Vereinzelte erfolgreiche Berichte (Eisinger et al. 1975) konnten in anderen Laboratorien bisher nicht bestätigt werden.

Auch unsere Versuche in dieser Richtung waren nicht erfolgreich. Die Hoffnung, über Temperatureffekte (niedrige Inkubationstemperatur) Virusvermehrung erreichen zu können, gründete sich auf die Lokalisation der Viruspartikel-haltigen Warzen (Epidermis) und Vorversuchen im hiesigen Laboratorium, die vorübergehend Viruspartikelsynthese in Verozellen bei 27° C aufzuzeigen schienen, die mit einem Kondylompräparat infiziert worden waren. Leider ließen sich auch diese Befunde nicht reproduzieren. Somit hat sich bis heute kein permissives System zur Virusvermehrung auffinden lassen. Die Gründe für die Schwierigkeiten der Warzenvirusvermehrung liegen weiterhin völlig im Dunklen.

Literaturverzeichnis:

- Almeida J.D., Oriel J.D., and Stannard L.M. 1969
Characterization of the virus found in human genital
warts.
Microbios 3: 225-232
- Arnold W. 1976
Ätiologische Aspekte zur Frage der Entstehung der
Larynxpapillome
Laryngol. Rhinol. Otol. 55: 102 -111
- Boyle W.F., Riggs J.L., Oshiro L., Lennette E. 1973
Electron microscopic identification of papova virus
in laryngeal papilloma
Laryngoscope 83: 1102 -1108
- Bunting H. 1953
Closepacked array of virus-like particles within cells
of human skin papilloma
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 84: 327 -332
- Burgess R.R. 1969
A new method for the large scale purification of
escherichia coli deoxyribonucleic acid-dependent ribo-
nucleic acid polymerase
J. Biol. Chem. 244: 6160-6167
- Ciuffo G. 1907
Innerto positivo con filtrats di verruca vulgare
Giorn. Ital. Mal. Venereol. 48: 12-17
- Davis C.L. and Kemper H.E. 1936
Common warts (papillomata) in goats
Journal of the American Veterinary Medical Association
41: 175-179
- Dulbecco R. and Voigt M. 1963
Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA
Microbiology 50: 236-243

- Dunn A.E.G. and Ogilvie M. 1968
Intranuclear virus particles in human genital wart tissue:
observations on the ultrastructure of the epidermal layer
J. Ultrastructure Research 22: 282-295
- Eisinger M., Kucarova O., Sarkar N., Good R. 1975
Propagation of human wart virus in tissue culture
Nature 256: 432-434
- Gissmann L. and zur Hausen H. 1976
Human papilloma virus DNA: Physical mapping and genetic
heterogeneity
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: No.4 1310 -1313
- Gissmann L., Pfister H., zur Hausen H. in Druck, J. of Virology
- Goldschmidt H. and Kligman A.M. 1958
Experimental inoculation of humans with ectodermotropic viruses
J. Invest. Dermatol. 31: 175-182
- Hirt B. 1967
Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse
cell cultures
J. Mol. Biology 26: 365 - 369
- Inokuchi T., Ikejiri S., Mizuno F. and Osato T. 1975
Activation by 5-5-iododeoxyuridine of Shope papilloma
viral genome in cultured VX2 and VX7 carcinomas
Archives of Virology 48: 275-277
- Ischikawa K. 1936
Klinische und experimentelle Untersuchungen über die Ent-
stehungsursachen der Papillome
Fukuoka Acta Med. 29: 87-88
- Kleinsasser O. and Cruz G.O. 1973
"Juvenile" und "adulte" Kehlkopfapillome
HNO 21: 97-106
- Mothes E. 1973
Untersuchungen über Sequenzhomologien zwischen DNS aus
Normal- und Tumorgewebe des Goldhamsters und Papovavirus-
DNS mittels DNS x DNS-Hybridisierung
Acta biol. med. germ. 30: 341-351

- Olson C., Pamucka A.M., Brobst D.F., Kowalczyk T.,
Satter E.J., and Price J.M. 1959
A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous
papilloma agent
Cancer Res. 19: 779-782
- Olson C., Robl M.G., and Larson L.L. 1968
Cutaneous and penile bovine fibropapillomatosis and its
control
J. Amer. Vet. Med. Ass. 153: 1189-1194
- Oriel J. D. and Almeida J.D. 1970
Demonstration of virus particles in human genital warts
British J. Vener. Diseases 46: 37-42
- Radloff R., Bauer W. and Vinograd J. 1967
A dye-boyant-density method for the detection and isolation
of close circular duplex DNA: the closed circular DNA in
HELA-cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57: 1514-1521
- Rous P. and Beard J.W. 1934
Carcinomatous changes in virus-induced papillomas of the
skin of the rabbit.
Proc. Nat. Acad. Sci. 52: 1340
- Rowson K.E.K. and Mahy B.W.J. 1967
Human papova (wart) virus
Bacteriological Reviews Vol. 31: 110-131
- Ruiter M. and van Mullem 1970
Behaviour of virus on malignat degeneration of skin lesion
in epidermodysplasia verruciformis
The Journal of Invest. Dermatology 54: No.4 324 - 331
- Serra A. 1924
Studi sul virus della verruca, del papilloma, del con-
diloma acuminato (etiologia, patogenesi, filtrabilita):
nota preventiva
Giorn. Ital. Mal. Venereol. 65: 1808 -1814
- Shope R.E. 1933 Infectious papillomatosis of rabbits
J. exp. Med. 58: 607-624

Tai H.R., Smith C.A., Sharp P.A., and Vinograd J., 1972
Sequence heterogeneity in close simian virus 40 deoxy-
ribonucleic acid

J. Virol. 9: 317-325

Tokita H. and Konishe Sh. 1975

Studies on canine oral papillomatosis II. oncogenicity
of canine oral papilloma virus to various tissues of
dog with special reference to eye tumor

The Japanese Journal of Veterinary Science Vol. XXXVII,
No. 2

Ullman E.V.: 1923

On the aetiology of the laryngeal papilloma

Acta Oto-Laryngol. 5: 317-334

Waelisch L. 1918

Übertragungsversuche mit spitzen Kondyloma

Arch. Dermatol. Syphilis 124: 625-646

Zimmer S., Bahnsch R. und Grimm Chr. 1964

Morphologischer Virusnachweis bei Warzen und spitzen
Kondylomen

Dermatologische Wochenschrift 19: 490-495

zur Hausen H., Schulte-Holthausen H., Klein G., Henle W.,
Henle G. Clifford P and Santesson L. 1970

EBV-DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic
carcinomas of the nasopharynx

Nature(London) 228: 1056-1058

zur Hausen H., Diehl V., Wolf H., Schulte-Holthausen H.
and Schneider U. 1972

Occurrence of EB-virus genomes in human lymphoblastoid
cell lines

Nature (London) 237: 189-190

zur Hausen H., Meinhof W., Schreiber W., Bornkamm G.W.
1974

Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors
I. Nucleic acid hybridisations with complementary RNA
of human wart virus

Int. J. Cancer 13: 650-656

zur Hausen H. 1976

Condylomata acuminata and human genital cancer
Cancer Research 36: 794

zur Hausen H., Gissmann L., Steiner W., Dippold W.,
Dreger I.

Human papilloma viruses and cancer
Bibliotheca haematol. 43: 569-571

zur Hausen H. and Sokol F. 1969

The fate of adenovirus type 12 genomes in nonpermissive
cells

J. Virol. 4: 256-263

F. Lebenslauf

Am 12.6.1951 wurde ich, Wolfgang Dippold, als Sohn des Ehepaars Baptist und Benigna Dippold, geborene Wolf, in Bamberg geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule und von 1961 bis 1970 den humanistischen Zweig des Franz-Ludwig-Gymnasiums in Bamberg.

Das Reifezeugnis erhielt ich am 20. Juni 1970. An der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen studierte ich dann Medizin, bis ich dort am 3. August 1976 das Staatsexamen erfolgreich ablegen konnte.

Erlangen, den 15. November 1976

Wolfgang Dippold

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990